

## APPORTS DE LA TRANSGENESE A L'AMELIORATION DU RIZ L'EXEMPLE DU RIZ DORE

Emmanuel GUIDERDONI et Jean Christophe BREITLER

CIRAD

UMR PIA 1096

TA40/03

34398 Montpellier Cedex 5

### 1 - INTRODUCTION

Le riz cultivé d'origine asiatique, *Oryza sativa* L., constitue la première céréale de consommation humaine et la nourriture de base de plus de la moitié de l'humanité. C'est aussi une plante présentant une grande diversité morpho-physiologique, héritage de deux domestications indépendantes et reflet de l'adaptation des cultivars à des écosystèmes variés (irrigué, inondé, pluvial, flottant ou de mangrove). Deux sous espèces, *japonica* et *indica* ont radié à partir de formes annuelles d'*Oryza rufipogon* au travers de ces deux domestications parties respectivement du nord et du sud de l'Himalaya il y a plus de 10 000 ans. L'importance socio économique du riz et son relatif délaissement par la recherche internationale au début des années 1980 en ont fait une céréale cible pour appliquer les outils modernes de la biologie cellulaire et moléculaire végétales au travers d'un vaste programme international financé par la fondation Rockefeller en 1985. Ce programme s'est achevé à la fin des années 90, les initiatives de génomique japonaises, coréennes et chinoises ayant successivement pris le relais de la fondation américaine, relais ayant culminé avec la publication des séquences des génomes des riz *japonica* (MATSUMOTO *et al.* 2005) et *indica* (YU *et al.* 2002). Le riz a été dans ce cadre, et également par l'initiative des compagnies privées (Agracetus, aux USA et Mistubishi Chemicals et Japan Tobacco au Japon), la première céréale ayant permis la régénération de plantes transformées à partir de protoplastes (SHIMAMOTO *et al.* 1989) et après co-culture de cals avec *Agrobacterium tumefaciens* (HIEI *et al.* 1994). Des méthodes efficaces de transfert de gènes par accélération de microprojectiles sur des scutellum d'embryons immatures (CHRISTOU *et al.* 1991) et des cals dérivés du scutellum de l'embryon de grain matures (CHEN *et al.* 1998) ont également été mises au point. Le transfert de gènes d'intérêt a débuté assez tôt puisque les premières plantes exprimant une toxine de *Bacillus thuringiensis* et tolérantes aux foreurs des tiges et aux mineuses des feuilles ont été testées en laboratoire en 1993 (FUJIMOTO *et al.* 1993), puis au champ quelques années plus tard (TU *et al.* 2000; YE *et al.* 2001). La fondation Rockefeller a, sur cette lancée, financé des projets de transferts de gènes visant une tolérance accrue aux agressions abiotiques (sécheresse, salinité) et biotiques (virus, insectes piqueur-suceurs et défoliateurs, champignons et bactéries) et à l'amélioration de la qualité nutritionnelle du grain. Le programme le plus emblématique dans cette dernière catégorie est sans doute celui visant la mise au point du riz enrichi en  $\beta$ -carotène, le riz doré, qui a ensuite été appuyé par la Commission Européenne (YE *et al.* 2000), et sur lequel nous reviendrons plus loin. Alors que des variétés de riz transgéniques ont été diffusées en Iran et que la Chine pourrait procéder à leur dérégulation dans les mois à venir, l'objet de cette revue est de dresser un panorama des

réalisations marquantes dans le domaine de la transgénèse du riz, en détaillant les avancées les plus récentes et notamment l'exemple du riz doré, et de voir quelles sont celles ayant le plus de chances d'appuyer l'amélioration variétale de cette espèce dans les années à venir. Pour de plus amples détails sur le sujet, des revues exhaustives ont par ailleurs été publiées (BAJAJ and MOHANTY 2005; TYAGI and MOHANTY 2000).

## 2 -LA TRANSGENESE CHEZ LE RIZ : ETAT DE L'ART

La transformation par co-culture de cals embryogènes avec la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* est aujourd'hui largement adoptée dans les laboratoires. Les techniques utilisées sont dérivées du protocole originellement mis au point par Hiei et collaborateurs (HIEI *et al.* 1994) à Japan Tobacco, mais avec des ajustements techniques (e.g. sélection des cals mis en co-culture, procédure de sélection des lignées cellulaires transformées), ayant permis de multiplier par 10 son efficacité (SALLAUD *et al.* 2003). On est aujourd'hui capable de produire de 5 à 10 plantes transformées indépendantes à partir d'un fragment de cal co-cultivé. Cette efficacité à haut débit, sans commune mesure avec ce qui est observé chez les autres céréales, a permis la mise en œuvre de programmes de mutagenèse insertionnelle par ADN-T (GUIDERDONI *et al.* 2006) et la recherche de rares événements de recombinaison homologue (TERADA *et al.* 2002) chez cette plante.

Les gènes sélectionnables utilisés sont les gènes *hptII* et *nptII* conférant respectivement une résistance à l'hygromycine ou à la kanamycine, le gène *bar* conférant une résistance au glufosinate étant peu efficace pour discriminer les lignées cellulaires transformées à partir de cals (alors qu'il est utilisable pour la sélection de protoplastes transformés ou de cellules de scutellum d'embryons bombardés). D'autres gènes sélectionnables ont été utilisés comme la phosphomannose isomérase (LUCCA *et al.* 2001b) ou l'UDP glucose:galactose-1-phosphate udyI transférase (JOERSBO *et al.* 2003) permettant respectivement une croissance des cellules transformées sur mannose et galactose au lieu du saccharose comme source de carbone.

Un promoteur de type 35S du CaMV est suffisant pour gouverner le gène sélectionnable tandis que des promoteurs plus efficaces, comme celui du gène de l'ubiquitine 1 du maïs, sont généralement utilisés pour gouverner de façon constitutive l'expression de gènes d'intérêt. Les vecteurs utilisés classiquement sont des dérivés de pZp avec notamment la très renommée série de vecteurs binaire CAMBIA diffusés en 1997 par l'équipe de R. Jefferson ([www.cambia.org](http://www.cambia.org)). Les souches bactériennes EHA105 et LBA4404 montrent une efficacité comparable à réaliser le transfert de gènes chez le riz. Le procédé de Japan Tobacco étant couvert par un brevet générique très large, des laboratoires ont essayé de le contourner avec succès, bien qu'avec des efficacités moindres, en utilisant d'autres espèces bactériennes capables d'effectuer un transfert dans les cellules végétales (BROOHAERTS *et al.* 2005) ou des explants fraîchement mis en culture comme de jeunes inflorescences (DONG *et al.* 2001) ou de très jeunes cals de scutellum (TOKI *et al.* 2006).

Il existe une grande variation d'aptitude à la transformation entre les variétés de riz qui reflète leur aptitude à la culture *in vitro* et plus précisément à maintenir sous un état proliférant non différencié des cellules de cals. Les variétés *japonica* montrent généralement une bonne aptitude à former des cals mais qui régénèrent des plantes entières avec des fréquences variées tandis que les variétés *indica* forment des cals embryogènes qui tendent former des embryons plutôt que des cals maintenus dans un état non différencié qui conduisent fréquemment à la néoformation de plantes. Un QTL intervenant dans l'aptitude à la régénération à partir de cals formés de la variété *indica* Kasalath a ainsi été récemment cloné : il code pour une ferrédoxine nitrite réductase qui s'exprime moins fortement chez la variété *japonica* Koshihiraki qui présente une faible aptitude à la régénération, l'assimilation des nitrates étant un facteur clé de la néoformation de plantes chez le riz (NISHIMURA *et al.* 2005). Ce gène a pu

également être utilisé comme marqueur de sélection positif pour transformer la variété Koshihiraki ou d'autres variétés possédant une faible aptitude à la régénération.

Outre son utilisation pour le transfert de gènes d'intérêt agronomique, il faut également souligner la large utilisation de la transgénèse dans des programmes d'analyse fonctionnelle de promoteurs et de gènes issus du riz ou d'autres espèces, de transfert de grands fragments d'ADN de type BAC ainsi que dans les programmes d'inactivation de gènes par mutagenèse insertionnelle, interférence de l'ARN ou ciblage génique.

### **3 - CARACTERISTIQUES DES PLANTES ADN-T DE RIZ**

Les transformants ADN-T de riz ne diffèrent pas fondamentalement des autres monocotylédones et dicotylédones transformées par *Agrobacterium tumefaciens*, notamment *Arabidopsis*. Le développement et la caractérisation de larges collections de lignées d'insertion ADN-T a permis d'avoir une idée plus précise de l'intégration et de l'organisation de l'ADN-T dans les plantes transformées de riz. Une moyenne de deux copies de l'ADN-T à 1,5 locus d'insertion est en général observée. L'intégration de séquences du vecteur binaire, lié à un transfert dépassant la bordure gauche de l'ADN-T ou débutant à la bordure gauche, et pouvant être complet, survient dans 30 à 40% des cas, et sa fréquence est corrélée positivement avec le nombre de copies de l'ADN-T intégrées. Le séquençage de plusieurs dizaines de milliers de régions chromosomiques adjacentes aux sites d'insertion de l'ADN-T depuis le début des années 2000, réalisé par différentes équipes, avec différents cultivars et construits ADN-T en utilisant diverses méthodes d'amplification PCR, a conduit à des résultats concordants (AN *et al.* 2003; HSING *et al.* 2006; SALLAUD *et al.* 2004; ZHANG *et al.* 2006). Ainsi, les inserts ADN-T ont une distribution relativement aléatoire entre les chromosomes, avec toutefois une tendance à une plus forte densité d'insertion sur les chromosomes 1,2 et 3 qui sont également les plus longs et portent le plus de gènes, et se retrouvent de préférence dans les régions subtélomériques et euchromatiques par rapport aux régions centromériques et hétérochromatiques. On les retrouve surtout dans les régions riches en gènes comme en témoignent les corrélations établies le long des chromosomes entre la densité de séquences exprimées (ADNc pleine longueur) et celle des inserts ADN-T dans un intervalle donné. Enfin, ces inserts ADN-T se retrouvent en fréquences relativement équivalentes dans les régions géniques et dans les régions intergéniques mais sont très rares dans les régions d'ADN répété. Dans les gènes, une fréquence plus élevée d'intégration est observée dans les régions 5' en amont du codon ATG et autour de celui-ci, ainsi que dans les régions autour et en aval du codon STOP.

### **4 - METHODES D'ELIMINATION DE L'ADN SUPERFLU ET D'INTEGRATION CIBLEE DES TRANSGENES DANS LES TRANSFORMANTS**

L'intégration du vecteur de clonage, avec ses origines de réplication bactérienne et ses gènes de résistance aux antibiotiques, posant un problème vis-à-vis de la réglementation et n'étant pas évitable dans le cas des méthodes de transfert direct utilisant des plasmides complets, l'utilisation de cassettes de gènes obtenues par restriction enzymatique d'ADN plasmidique, a permis l'obtention de plantes transgéniques par biolistique sans intégration de vecteur bactérien dans le génome (BREITLER *et al.* 2002; FU *et al.* 2000; LOC *et al.* 2002). Un autre type de séquence indésirable dans les transformants mis au champ ou commercialisés est le gène marqueur. Différentes méthodes ont été utilisées chez le riz pour éliminer ce gène : excision du gène marqueur par les systèmes de recombinaison Cre/lox (SREEKALA *et al.* 2005) ou R/RS (ENDO *et al.* 2002) ou par intégration puis ségrégation indépendante du gène marqueur et du gène d'intérêt (vecteur double ADN-T (BREITLER *et al.* 2004a; KOMARI *et al.*

1996) ; utilisation de deux vecteurs porteurs d'un ADN-T (système pGreen/pSoup (VAIN *et al.* 2003)), avec un vecteur à double bordure droite (LU *et al.* 2001) et un vecteur de repositionnement du gène d'intérêt médiée par les système *Ac/Ds* (COTSAFTIS *et al.* 2002). A noter que ce dernier système a permis l'obtention de plantes contenant le transgène d'intérêt (le gène *cry1B*) bordé des séquences inversées terminales du transposon *Ac*, correctement exprimé et conférant une résistance aux foreurs des tiges.

Un autre objectif est d'obtenir une intégration ciblée des transgènes, alors que nous avons vu que l'ADN-T s'intègre de façon relativement aléatoire dans les régions riches en gènes du génome. Cette intégration peut être pilotée par une homologie de séquence par rapport à un site naturel du génome (TERADA *et al.* 2002), vers un site *lox* pré-introduit par transgénèse (SRIVASTAVA *et al.* 2004) ou encore par « reconnaissance spécifique protéine : ADN » (domaines à doigt de zinc). Les progrès accomplis pour une intégration ciblée par recombinaison homologue basés sur l'utilisation de larges séquences d'homologies et l'utilisation de gènes contre sélectionnant les événements d'intégration par recombinaison illégitime permettent à présent d'atteindre des fréquences de ciblage génique de 1 à 2%, comme cela a pu être montré avec les gènes *waxy* et *adh1* (IIDA and TERADA 2005; TERADA *et al.* 2002).

## 5 - LE TRANSFERT DE GENES D'INTERET AGRONOMIQUE POUR LA RESISTANCE AUX AGRESSIONS BIOTIQUES ET ABIOTIQUES

Après le gène *bar* conférant une tolérance à l'herbicide glufosinate d'ammonium par détoxification, utilisé comme marqueur de sélection, les premiers gènes d'intérêt à avoir été transférés au riz sont les gènes de  $\delta$ -endotoxine de la bactérie *Bacillus thuringiensis*, qui ont été introduits dans les riz *japonica* (FUJIMOTO *et al.* 1993) puis *indica* (WUNN *et al.* 1996). Des versions souvent synthétisées avec une préférence de codon adaptée aux plantes, voire aux céréales, des gènes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B*, *cry2A* et *cry9C* ont été introduites seules, en combinaison ou encore en combinaison avec des gènes codant pour des protéines à autre mode d'action comme les inhibiteurs de protéases ou les lectines. Les essais au champ, réalisés dès 1997 en Chine (YE *et al.* 2001) ont été concluants, permettant une protection contre différentes catégories de ravageurs (SHU *et al.* 2000), préservant la diversité des insectes non cibles (HIGH *et al.* 2004) et évitant l'épandage de pesticides très nocifs en premier lieu pour la santé des riziculteurs (HUANG *et al.* 2005). Ces avantages ont poussé le gouvernement Chinois à aboutir dans un avenir très proche à la commercialisation d'un riz Xianyou 63 exprimant un gène hybride *cry1Ab :cry1Ac* résistant aux foreurs et aux tordeuses de feuilles et ce, malgré les craintes de rétorsion à l'encontre des exportations des nombreux produits dérivés du riz. Seul le fait que ce gène ait d'abord été introduit dans une formule hybride a ralenti son « adoption anticipée » par les paysans. Des essais au champ concluants de riz *Bt* ont également été réalisés sur d'autres continents et un riz *Bt* a récemment été diffusé en Iran. Si les stratégies d'expression des gènes *cry* ont fait généralement appel à des promoteurs constitutifs (ubiquitine du maïs) ou tissu spécifiques (PEP carboxylase du maïs), une approche originale a consisté à les faire exprimer sous le contrôle d'un promoteur inductible par la blessure (inhibiteur de protéases du maïs (CORDERO *et al.* 1994), évitant une accumulation en continu dans la plante et dans les parties destinées à la consommation humaine, l'albumen du grain, ou d'insectes non cible, le pollen (BREITLER *et al.* 2001; BREITLER *et al.* 2004b).

L'autre catégorie de gènes à activité entomopathogène ayant été introduite chez le riz est celle formée par les gènes de lectine, d'albumines et d'inhibiteurs de protéases d'origine végétale. Le gène *gna* du perce neige codant pour une lectine spécifique du mannose a notamment été transféré dans différents cultivars de riz pour lutter en premier lieu contre les insectes

piqueurs suceurs (cicadelle). Les inhibiteurs de protéases à cystéine (IRIE *et al.* 1996) et à sérine (VILA *et al.* 2005) du maïs, à cystéine du riz (Hosoyama *et al.* 1992), à sérine de la pomme de terre (DUAN *et al.* 1996), et de trypsine du soja (Lee *et al.* 1999), du pois (MOCHIZUKI *et al.* 1999) et du vigna (Xu *et al.* 1996) ont été transférés dans le riz. Le premier riz exprimant un inhibiteur de protéases testé au champ a été un riz ayant intégré le gène *pinII* de la pomme de terre sous le contrôle de son propre promoteur inductible par blessure et de l'intron d'actine 1 du riz et conférant un bon niveau de protection contre les foreurs des tiges (DUAN *et al.* 1996). Bien que les résultats de protection avec ces classes de protéines aient été en général en deçà des espérances et rarement testés au champ, un riz transgénique Youming 86 exprimant un gène synthétique d'inhibiteur de protéases du vigna pourrait être commercialisé en Chine. Des résultats récents ont par ailleurs montré que la protection contre les insectes ravageurs des stocks de grains est possible par expression d'une glycoprotéine du blanc d'œuf, l'avidine (YOZA *et al.* 2005) et d'une albumine de la graine de petit pois, PA1b (PETIT *et al.* 2006).

Différentes stratégies ont été utilisées pour lutter contre les maladies fongiques (Magnaporthe, Rhizoctonia), bactériennes (Xanthomonas) et virales (Rice Tungro virus, Rice Yellow Mottle Virus, Rice stripe virus, Rice Hoja Blanca Virus, Rice Ragged Stunt Virus) du riz. Pour les bactéries et champignons, les meilleures protections ont pour le moment été celles apportées par des gènes de résistance naturelle isolés du riz ou de ses espèces apparentées, tandis que les méthodes d'expression de gènes du pathogène se sont montrées efficaces pour le RTSV, RHBV et le RYMV (respectivement une réplicase (HUET *et al.* 1999), une protéine de nucléocapside (LENTINI *et al.* 2003) et l'ARN polymérase ARN dépendante (PINTO *et al.* 1999) du virus).

Des tolérances accrues aux contraintes abiotiques (froid, salinité, anoxie, sécheresse, haute température) ont été recherchées chez le riz comme chez les autres plantes par des approches classiques de surexpression, constitutive ou inductible par le stress, de gènes dont les produits sont impliqués dans les voies de signalisation (eg : kinases (SAIJO *et al.* 2000; XIONG and YANG 2003)) ou de régulation (eg facteurs de transcription (DUBOUZET *et al.* 2003; OH *et al.* 2005) qui confèrent directement une tolérance à la cellule (eg protéines LEA (BABU *et al.* 2004; XU *et al.* 1996), aquaporines (KATSUHARA *et al.* 2003), protéines de choc thermique (MURAKAMI *et al.* 2004)) ou sont des enzymes de voies métaboliques conduisant à la synthèse de métabolites structuraux et fonctionnels (eg : osmoprotectants comme la proline, (HUR *et al.* 2004; SU and WU 2004) la glycine bêtaïne (SAKAMOTO and MURATA 2002), ou les sucres comme le tréhalose (GARG *et al.* 2002; JANG *et al.* 2003)). Les carences minérales ont été ciblées par l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores telles la nicotianamine aminotransférase et la nicotianamine synthétase (TAKAHASHI *et al.* 2001). Cependant si des améliorations de tolérance ont pu être observées *in vitro* ou en serre avec ces plantes, leurs performances n'ont encore que rarement été évaluées en conditions réelles de contrainte abiotique au champ.

## **6 – AMELIORATION DE LA QUALITE DU GRAIN : LE CAS EMBLEMATIQUE DU RIZ DORE**

Les améliorations qualitatives du grain ont visé l'amidon (dérégulation, inactivation ou mutation du gène Waxy intervenant dans la synthèse d'amylose), les protéines de réserve et l'augmentation ou la réduction du niveau de certains acides aminés (glycine, cystéine, lysine tryptophane) et la diminution de l'accumulation de protéines allergènes. Les approches d'augmentation de l'apport en fer par une ration alimentaire à base de riz ont consisté en l'expression constitutive ou spécifique de l'albumen de gènes de ferritine du soja (GOTO *et al.* 1999) et du pois (LUCCA *et al.* 2001a) et l'expression de gènes intervenant dans la synthèse de

phytase qui inhibe l'action de l'acide phytique par hydrolyse et augmente ainsi la biodisponibilité du fer présent dans le grain (HONG *et al.* 2004; LUCCA *et al.* 2001a). Cependant, le transfert du fer dans le phloème semble être un verrou important limitant l'accumulation dans le grain (QU LE *et al.* 2005). D'autres études ont porté sur la modification de la friabilité du grain par accumulation de la puroindoline b du blé tendre (KRISHNAMURTHY and GIROUX 2001), qui a par ailleurs une activité antifongique (KRISHNAMURTHY *et al.* 2001). Enfin, le grain de riz a été utilisé comme support pour y exprimer des protéines recombinantes, telles la lactoferrine (NANDI *et al.* 2002) ou le lysozyme (HUANG *et al.* 2002) humain ou réaliser une immunothérapie par voie orale par expression de peptides épitopes d'allergènes (OKADA *et al.* 2003).

Cependant l'exemple le plus emblématique de l'amélioration de la qualité nutritive du grain de riz est celui du transfert de gènes intervenant dans la biosynthèse de la provitamine A (BURKHARDT *et al.* 1997), aboutissant à la création très médiatisée du riz doré. La carence en vitamine A est en effet un problème sanitaire important au niveau international qui touche particulièrement les populations défavorisées des pays en développement dont l'alimentation est souvent basée sur le riz. Les chiffres de l'OMS parlent de 800 millions de personnes en situation de carence, et entre 250 000 et 500 000 enfants par an affectés de cécité liée à cette carence. Une des stratégies pour pallier cette situation -avec d'autres éléments comme la diversification alimentaire et les programmes de fourniture de vitamine A-, a donc consisté à faire s'accumuler dans l'albumen du riz qui en est dépourvu du  $\beta$ -carotène par transfert des gènes intervenant dans sa biosynthèse. La voie de biosynthèse chez les plantes repose sur l'action successive de 5 enzymes à partir du geranylgeranyl diphosphate, la phytoène synthase (PSY), la phytoène desaturase (PDS), la carotène desaturase (ZDS) et la lycopène  $\beta$ -cyclase ( $\beta$ -LCY) et hydrolyase ( $\beta$ -HYD). Les études ayant montré que les principales barrières à l'accumulation de  $\beta$ -carotène chez le riz étaient l'absence des enzymes PSY et ZDS dans l'albumen du grain. Le premier prototype de riz doré (variété modèle *japonica* Taipei 309), développé à l'école polytechnique de Zurich en liaison avec l'Université de Freiburg sur des financements de la fondation Rockefeller et de l'Union Européenne, a donc consisté à transférer de façon liée sur le même ADN-T les gènes *psy* de Narcisse et le gène *crt1* de la bactérie *Erwinia*, qui convertit directement le phytoène en lycopène et accomplit donc la fonction des gènes *pds* et *zds*. Les gènes *psy* et *crt1* étaient placés sous le contrôle des promoteurs de glutéline du riz et 35S du CaMV. Une autre expérience de co-transformation associait cet ADN-T avec un autre ADN-T portant le gène  *$\beta$ -lcy* de narcisse sous le contrôle du promoteur de glutéline du riz. Les résultats ont montré que l'introduction de cette dernière cassette de gènes n'était pas nécessaire à l'accumulation de  $\beta$ -carotène dans le riz, puisque les activités lycopène  $\beta$ -cyclase ( $\beta$ -LCY) et hydrolyase ( $\beta$ -HYD) étaient induites dans l'albumen du grain de riz suite à la nouvelle accumulation de lycopène. Une accumulation de  $\beta$ -carotène de 1,6 à 2  $\mu\text{g/g}$  a été observée dans les grains des meilleurs événements de transformation, démontrant ainsi la faisabilité de la modification (YE *et al.* 2000). Les objectifs des travaux de recherche suivants ont visé simultanément à augmenter la production de carotène, par l'utilisation d'un promoteur de sucrose synthase gouvernant la transcription d'un gène synthétique *crt1*, à utiliser des variétés *indica* élite (IR64, MTL250) et utiliser comme marqueur de sélection le gène PMI codant pour la phosphomannose isomerase (voir plus haut) (HOA *et al.* 2003) en lieu et place d'un gène de résistance à un antibiotique. L'accumulation observée de carotène variait de 0,1 à 0,9  $\mu\text{g/g}$  dans les grains T1 et de 0,8  $\mu\text{g/g}$  en moyenne dans les grains T2 des lignées de riz doré indica. En parallèle, la société Syngenta parvenait à atteindre une accumulation de 6 $\mu\text{g/g}$  dans les grains des événements de transformation débarrassés de marqueurs de sélection de riz *javanica* (*japonica* tropical) en utilisant le promoteur de glutéline pour gouverner le gène *crt1*. Cette relativement faible accumulation de carotène dans l'albumen du grain -même s'il s'agit d'une prouesse technologique- et la

surmédiation du riz doré relayée à grand bruit par les sociétés multinationales a conduit à l'éclatement d'une polémique sur la capacité du riz doré à pallier les carences en vitamine A. L'ONG Greenpeace a été à la pointe de cette polémique, notamment en mettant en avant le calcul volontairement simpliste suivant : la dose recommandée journalière (DRJ) pour un enfant est de 300µg de vitamine A, alors que le riz doré n'en contient au maximum que 0,3 µg/g (rapport 1 :6 par rapport à la quantité de carotène accumulé de 1,8 µg/g), ce qui implique une consommation de 900 grammes de riz par jour (ou 3kg par adulte) en supposant une biodisponibilité de la vitamine A de 100%. La réponse de l'artisan du riz doré, Ingo Potrykus a été de dire que 30-40% de la DRJ permettait d'éviter la cécité (540g), que le riz peut ne représenter que 50% de la DRJ d'une diète (270g) et enfin qu'une augmentation par 3 de la quantité de carotène accumulée était tout à fait possible, ramenant à 90g la quantité de riz devant être ingérée par jour, plus en rapport avec les rations constatées. L'avenir allait lui donner raison sur ce dernier point puisqu'en 2005, la société Syngenta publiait l'obtention d'un riz doré de deuxième génération accumulant 31µg/g de carotène, représentant 84% des caroténoïdes totaux. Ce saut quantitatif a été obtenu en analysant systématiquement des ADNc orthologues du gène *psy* du narcisse et notamment ceux du maïs et du riz (PAINE *et al.* 2005). Cet accroissement permet d'atteindre 50% de la DRJ avec une ration quotidienne de 72 grammes de riz doré (un rapport de conversion en rétinol de 1 :12 est utilisé). Des essais de conservation (dégradation du carotène et clivage par la caroténoïde oxygenase) et des essais nutritionnels, notamment pour déterminer la biodisponibilité (absorption) et la bioefficacité (clivage enzymatique) du carotène contenu dans les grains de riz doré, sont actuellement en cours pour aboutir à une image globale de l'apport réel à l'organisme de vitamine A. Les événements de transformation de riz doré de première génération (gène PMI ou gène sélectionnable éliminé) ont été introgressés avec succès dans des variétés localement adaptées notamment par l'International Rice Research Institute, tandis que le même travail est en cours de réalisation avec le riz doré de deuxième génération à la teneur en carotène supérieure. Reste en suspens le problème de l'adoption du riz doré par des populations culturellement attachées à la pureté blanche du bol de riz. Signalons pour terminer que les propriétaires des quelques 70 brevets qui sous tendent la création du riz doré -la complexité de la situation juridique ayant sans doute contribué à cette prise de décision- ont, au final, renoncé à faire valoir leurs droits dans les pays du Sud les plus pauvres. Enfin, un autre processus assez long a également été entrepris pour réaliser les tests de sécurité alimentaire et d'équivalence sur ce matériel.

Sur la lancée du riz doré, de grands projets internationaux ont été initiés, notamment au travers du *Global Challenge Program* de biofortification « *Harvest Plus* » et des *Grand Challenges for Global Health* de la fondation Bill and Melinda Gates, sur les grandes cultures du mandat des centres du Groupe Consultatif pour la Recherche Agronomique Internationale. En combinant les approches d'évaluation de la diversité naturelle et de sélection conventionnelle pour ces caractères et des approches de transgénèse, ces projets visent à obtenir des nouvelles variétés combinant des contenus améliorés en vitamines (A, E..), en acides aminés et en oligoéléments (Fe, Zn..) essentiels.

## 7 - CONCLUSION

Après avoir été parmi les premières céréales chez lesquelles des techniques efficaces de transformation génétique ont été mises au point et utilisées avec succès pour transférer des gènes d'intérêt, le riz constituera sans doute la prochaine plante de grande culture pour la commercialisation de variétés transgéniques. Comme nous l'avons décrit, les riz tolérants aux herbicides, résistants aux insectes et présentant des qualités nutritionnelles du grain améliorées seront les premiers à être diffusés. Cependant, des problèmes subsistent quant à

l'acceptabilité actuelle de ce type de produit par les consommateurs en Europe et au Japon, qui ont considérablement ralenti sa mise sur le marché, les pays comme la Chine ou la Thaïlande par exemple craignant un impact négatif de la mise en culture de ces nouvelles variétés sur leurs exportations. Dans le cas des résistances aux insectes, qui ont montré leurs bénéfices sur la diminution de l'impact environnemental et sanitaire des pesticides, et de l'accumulation de carotène dans le grain, qui pourrait clairement être un élément parmi d'autres limitant les carences en vitamine A dans les pays les plus pauvres, cette attitude de blocage, qui conduit à un retard significatif de la diffusion de ces produits auprès des petits paysans, s'avèrera *in fine* préjudiciable en terme de santé publique et de qualité environnementale.

## BIBLIOGRAPHIE

- AN, S. Y., S. PARK, D. H. JEONG, D. Y. LEE, H. G. KANG *et al.*, 2003 Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice. *Plant Physiology* **133**: 2040-2047.
- BABU, R. C., J. X. ZHANG, A. BLUM, T. H. D. HO, R. WU *et al.*, 2004 HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* **166**: 855-862.
- BAJAJ, S., and A. MOHANTY, 2005 Recent advances in rice biotechnology towards genetically superior transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 275-307.
- BREITLER, J. C., M. J. CORDERO, M. ROYER, D. MEYNARD, B. SAN SEGUNDO *et al.*, 2001 The-689/+197 region of the maize protease inhibitor gene directs high level, wound-inducible expression of the cry1B gene which protects transgenic rice plants from stemborer attack. *Molecular Breeding* **7**: 259-274.
- BREITLER, J. C., A. LABEYRIE, D. MEYNARD, T. LEGAVRE and E. GUIDERDONI, 2002 Efficient microprojectile bombardment-mediated transformation of rice using gene cassettes. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 709-719.
- BREITLER, J. C., D. MEYNARD, J. VAN BOXTEL, M. ROYER, F. BONNOT *et al.*, 2004a A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of marker-free transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Transgenic Research* **13**: 271-287.
- BREITLER, J. C., J. M. VASSAL, M. D. CATALA, D. MEYNARD, V. MARFA *et al.*, 2004b Bt rice harbouring cry genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 417-430.
- BROOthaerts, W., H. J. MITCHELL, B. WEIR, S. KAINES, L. M. A. SMITH *et al.*, 2005 Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* **433**: 629-633.
- BURKHARDT, P. K., P. BEYER, J. WUNN, A. KLOTI, G. A. ARMSTRONG *et al.*, 1997 Transgenic rice (*Oryza sativa*) endosperm expressing daffodil (*Narcissus pseudonarcissus*) phytoene synthase accumulates phytoene, a key intermediate of provitamin A biosynthesis. *Plant J* **11**: 1071-1078.
- CHEN, L., S. ZHANG, R. N. BEACHY and C. M. FAUQUET, 1998 A protocol for consistent, large scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Reports* **18**: 25-31.
- CHRISTOU, P., T. L. FORD and M. KOFRON, 1991 Production of Transgenic Rice (*Oryza Sativa* L.) Plants from Agronomically Important Indica and Japonica Varieties via Electric Discharge Particle Acceleration of Exogenous DNA into Immature Zygotic Embryos. *Nat Biotech* **9**: 957-962.



- CORDERO, M. J., D. RAVENTOS and B. SAN SEGUNDO, 1994 Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-response of a monocot gene. *Plant J* **6**: 141-150.
- COTSAFTIS, O., C. SALLAUD, J. C. BREITLER, D. MEYNARD, R. GRECO *et al.*, 2002 Transposon-mediated generation of T-DNA- and marker-free rice plants expressing a Bt endotoxin gene. *Molecular Breeding* **10**: 165-180.
- DONG, J. J., P. KHARB, W. M. TENG and T. C. HALL, 2001 Characterization of rice transformed via an *Agrobacterium*-mediated inflorescence approach. *Molecular Breeding* **7**: 187-194.
- DUAN, X., X. LI, Q. XUE, M. ABO-El-SAAD, D. XU *et al.*, 1996 Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nat Biotech* **14**: 494-498.
- DUBOUZET, J. G., Y. SAKUMA, Y. ITO, M. KASUGA, E. G. DUBOUZET *et al.*, 2003 OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J* **33**: 751-763.
- ENDO, S., K. SUGITA, M. SAKAI, H. TANAKA and H. EBINUMA, 2002 Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system. *Plant Journal* **30**: 115-122.
- FU, X. D., L. T. DUC, S. FONTANA, B. B. BONG, P. TINJUANGJUN *et al.*, 2000 Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns *Transgenic Research* **9**: 11-19.
- FUJIMOTO, H., K. ITOH, M. YAMAMOTO, J. KYOZUKA and K. SHIMAMOTO, 1993 Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology (N Y)* **11**: 1151-1155.
- GARG, A. K., J. K. KIM, T. G. OWENS, A. P. RANWALA, Y. DO CHOI *et al.*, 2002 Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 15898-15903.
- GOTO, F., T. YOSHIHARA, N. SHIGEMOTO, S. TOKI and F. TAKAIWA, 1999 Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology* **17**: 282-286.
- GUIDERDONI, E., G. AN, S. M. YU, Y. I. HSING and C. Y. WU, 2006 T-DNA insertion mutants as a resource for rice functional genomics, pp. 187-227, edited by N. UPADHYAYA. Springer Verlag.
- HIEL, Y., S. OHTA, T. KOMARI and T. KUMASHIRO, 1994 Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* **6**: 271-282.
- HIGH, S. M., M. B. COHEN, Q. Y. SHU and I. ALTOSAAR, 2004 Achieving successful deployment of Bt rice. *Trends in Plant Science* **9**: 286-292.
- HOA, T. T. C., S. AL-BABILI, P. SCHAUB, I. POTRYKUS and P. BEYER, 2003 Golden indica and Japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology* **133**: 161-169.
- HONG, C. Y., K. J. CHENG, T. H. TSENG, C. S. WANG, L. F. LIU *et al.*, 2004 Production of two highly active bacterial phytases with broad pH optima in germinated transgenic rice seeds. *Transgenic Research* **13**: 29-39.
- HSING, Y.-I., C.-G. CHERN, M.-J. FAN, P.-C. LU, K.-T. CHEN *et al.*, 2006 A Rice Gene Activation/Knockout Mutant Population for High Throughput Functional Genomics Analysis. *Plant Mol Biol* (sous presse).
- HUANG, J. K., R. F. HU, S. ROZELLE and C. PRAY, 2005 Insect-resistant GM rice in farmers' fields: Assessing productivity and health effects in China. *Science* **308**: 688-690.
- HUANG, J. M., S. NANDI, L. Y. WU, D. YALDA, G. BARTLEY *et al.*, 2002 Expression of natural antimicrobial human lysozyme in rice grains. *Molecular Breeding* **10**: 83-94.

- HUET, H., S. MAHENDRA, J. WANG, E. SIVAMANI, C. A. ONG *et al.*, 1999 Near immunity to rice tungro spherical virus achieved in rice by a replicase-mediated resistance strategy. *Phytopathology* **89**: 1022-1027.
- HUR, J., K. H. JUNG, C. H. LEE and G. H. AN, 2004 Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science* **167**: 417-426.
- IIDA, S., and R. TERADA, 2005 Modification of endogenous natural genes by gene targeting in rice and other higher plants. *Plant Molecular Biology* **59**: 205-219.
- IRIE, K., H. HOSOYAMA, T. TAKEUCHI, K. IWABUCHI, H. WATANABE *et al.*, 1996 Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol Biol* **30**: 149-157.
- JANG, I. C., S. J. OH, J. S. SEO, W. B. CHOI, S. I. SONG *et al.*, 2003 Expression of a bifunctional fusion of the Escherichia coli genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology* **131**: 516-524.
- JOERSBO, M., K. JORGENSEN and J. BRUNSTEDT, 2003 A selection system for transgenic plants based on galactose as selective agent and a UDP-glucose : galactose-1-phosphate uridylyltransferase gene as selective gene. *Molecular Breeding* **11**: 315-323.
- KATSUHARA, M., K. KOSHIO, M. SHIBASAKA, Y. HAYASHI, T. HAYAKAWA *et al.*, 2003 Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant and Cell Physiology* **44**: 1378-1383.
- KOMARI, T., Y. HIEI, Y. SAITO, N. MURAI and T. KUMASHIRO, 1996 Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J* **10**: 165-174.
- KRISHNAMURTHY, K., C. BALCONI, J. E. SHERWOOD and M. J. GIROUX, 2001 Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 1255-1260.
- KRISHNAMURTHY, K., and M. J. GIROUX, 2001 Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nature Biotechnology* **19**: 162-166.
- LENTINI, Z., I. LOZANO, E. TABARES, L. FORY, J. DOMINGUEZ *et al.*, 2003 Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 1018-1026.
- LOC, N. T., P. TINJUANGJUN, A. M. R. GATEHOUSE, P. CHRISTOU and J. A. GATEHOUSE, 2002 Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulate higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding* **9**: 231-244.
- LU, H. J., X. R. ZHOU, Z. X. GONG and N. UPADHYAYA, 2001 Generation of selectable marker-free transgenic rice using double right border (DRB) binary vectors. *Australian Journal of Plant Physiology* **28**: 241-248.
- LUCCA, P., R. HURRELL and I. POTRYKUS, 2001a Approaches to improving the bioavailability and level of iron in rice seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **81**: 828-834.
- LUCCA, P., X. D. YE and I. POTRYKUS, 2001b Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent. *Molecular Breeding* **7**: 43-49.
- MATSUMOTO, T., J. Z. WU, H. KANAMORI, Y. KATAYOSE, M. FUJISAWA *et al.*, 2005 The map-based sequence of the rice genome. *Nature* **436**: 793-800.
- MOCHIZUKI, A., Y. NISHIZAWA, H. ONODERA, Y. TABEL, S. TOKI *et al.*, 1999 Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, Chilo suppressalis. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **93**: 173-178.

- MURAKAMI, T., S. MATSUBA, H. FUNATSUKI, K. KAWAGUCHI, H. SARUYAMA *et al.*, 2004 Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Molecular Breeding* **13**: 165-175.
- NANDI, S., Y. A. SUZUKI, J. M. HUANG, D. YALDA, P. PHAM *et al.*, 2002 Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula. *Plant Science* **163**: 713-722.
- NISHIMURA, A., M. ASHIKARI, S. LIN, T. TAKASHI, E. R. ANGELES *et al.*, 2005 Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 11940-11944.
- OH, S.-J., S. I. SONG, Y. S. KIM, H.-J. JANG, S. Y. KIM *et al.*, 2005 Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in Transgenic Rice Increased Tolerance to Abiotic Stress without Stunting Growth. *Plant Physiol.* **138**: 341-351.
- OKADA, A., T. OKADA, T. IDE, M. ITOH, K. TANAKA *et al.*, 2003 Accumulation of Japanese cedar pollen allergen, Cry j 1, in the protein body I of transgenic rice seeds using the promoter and signal sequence of glutelin GluB-1 gene. *Molecular Breeding* **12**: 61-70.
- PAINE, J. A., C. A. SHIPTON, S. CHAGGAR, R. M. HOWELLS, M. J. KENNEDY *et al.*, 2005 Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content. *Nat Biotechnol* **23**: 482-487.
- PETIT, J. A., G. CONEJERO, G. DUPORT, F. GRESSENT, Y. RAHBÉ *et al.*, 2006 PA1b, a garden pea albumin / knottin, protects transgenic rice against its major post-harvest pest *Sitophilus oryzae*. **soumis**.
- PINTO, Y. M., R. A. KOK and D. C. BAULCOMBE, 1999 Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes. *Nature Biotechnology* **17**: 702-707.
- QU LE, Q., T. YOSHIHARA, A. OOHARA, F. GOTO and F. TAKAIWA, 2005 Iron accumulation does not parallel the high expression level of ferritin in transgenic rice seeds. *Planta* **222**: 225-233.
- SAIJO, Y., S. HATA, J. KYOZUKA, K. SHIMAMOTO and K. IZUI, 2000 Over-expression of a single Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant Journal* **23**: 319-327.
- SAKAMOTO, A., and N. MURATA, 2002 The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell and Environment* **25**: 163-171.
- SALLAUD, C., C. GAY, P. LARMANDE, M. BES, P. PIFFANELLI *et al.*, 2004 High throughput T-DNA insertion mutagenesis in rice: a first step towards in silico reverse genetics. *Plant Journal* **39**: 450-464.
- SALLAUD, C., D. MEYNARD, J. VAN BOXTEL, C. GAY, M. BES *et al.*, 2003 Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet* **106**: 1396-1408.
- SHIMAMOTO, K., R. TERADA, K. IZAWA and H. FUJIMOTO, 1989 Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**: 274-276.
- SHU, Q. U., G. Y. YE, H. R. CUI, X. Y. CHENG, Y. B. XIANG *et al.*, 2000 Transgenic rice plants with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding* **6**: 433-439.
- SREEKALA, C., L. WU, K. GU, D. WANG, D. TIAN *et al.*, 2005 Excision of a selectable marker in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) using a chemically regulated Cre/loxP system. *Plant Cell Reports* **24**: 86-94.
- SRIVASTAVA, V., M. ARIZA-NIETO and A. J. WILSON, 2004 Cre-mediated site-specific gene integration for consistent transgene expression in rice. *Plant Biotechnology Journal* **2**: 169-179.

- SU, J., and R. WU, 2004 Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis. *Plant Science* **166**: 941-948.
- TAKAHASHI, M., H. NAKANISHI, S. KAWASAKI, N. K. NISHIZAWA and S. MORI, 2001 Enhanced tolerance of rice to low iron availability in alkaline soils using barley nicotianamine aminotransferase genes. *Nature Biotechnology* **19**: 466-469.
- TERADA, R., H. URAWA, Y. INAGAKI, K. TSUGANE and S. IIDA, 2002 Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nature Biotechnology* **20**: 1030-1034.
- TOKI, S., N. HARA, K. ONO, H. ONODERA, A. TAGIRI *et al.*, 2006 Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *Plant Journal* **47**: 969-976.
- TU, J. M., G. A. ZHANG, K. DATTA, C. G. XU, Y. Q. HE *et al.*, 2000 Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Nature Biotechnology* **18**: 1101-1104.
- TYAGI, A. K., and A. MOHANTY, 2000 Rice transformation for crop improvement and functional genomics. *Plant Science* **158**: 1-18.
- VAIN, P., A. S. AFOLABI, B. WORLAND and J. W. SNAPE, 2003 Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup. *Theor Appl Genet* **107**: 210-217.
- VILA, L., J. QUILIS, D. MEYNARD, J. C. BREITLER, V. MARFA *et al.*, 2005 Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal* **3**: 187-202.
- WUNN, J., A. KLOTI, P. K. BURKHARDT, G. C. BISWAS, K. LAUNIS *et al.*, 1996 Transgenic Indica rice breeding line IR58 expressing a synthetic cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Biotechnology (N Y)* **14**: 171-176.
- XIONG, L. Z., and Y. N. YANG, 2003 Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **15**: 745-759.
- XU, D., X. DUAN, B. WANG, B. HONG, T. HO *et al.*, 1996 Expression of a Late Embryogenesis Abundant Protein Gene, HVA1, from Barley Confers Tolerance to Water Deficit and Salt Stress in Transgenic Rice. *Plant Physiol* **110**: 249-257.
- YE, G. Y., Q. Y. SHU, H. W. YAO, H. R. CUI, X. Y. CHENG *et al.*, 2001 Field evaluation of resistance of transgenic rice containing a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* Berliner to two stem borers. *Journal of Economic Entomology* **94**: 271-276.
- YE, X. D., S. AL-BABILI, A. KLOTI, J. ZHANG, P. LUCCA *et al.*, 2000 Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**: 303-305.
- YOZA, K., T. IMAMURA, K. J. KRAMER, T. D. MORGAN, S. NAKAMURA *et al.*, 2005 Avidin expressed in transgenic rice confers resistance to the stored-product insect pests *Tribolium confusum* and *Sitotroga cerealella*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**: 966-971.
- YU, J., S. N. HU, J. WANG, G. K. S. WONG, S. G. LI *et al.*, 2002 A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp *indica*). *Science* **296**: 79-92.
- ZHANG, J., C. LI, C. WU, L. XIONG, G. CHEN *et al.*, 2006 RMD: a rice mutant database for functional analysis of the rice genome. *Nucleic Acids Res* **34**: D745-748.